

잣나무(*Pinus koraiensis Siebold et Zucc*)잎 추출물의 화장품 소재로서의 활용 가능성에 관한 연구

전명옥¹ · 문지선[†]

건국대학교 생물공학과¹, 중원대학교 뷰티헬스학과[†]
(2017년 8월 13일 접수: 2017년 8월 29일 수정: 2017년 9월 4일 채택)

Study on Applicability of *Pinus koraiensis Siebold et Zucc* Leaf Extract as a Cosmetic Ingredient

Myung-Ok Jeon¹ · Ji-sun Moon[†]

¹Department of Bioengineering, Konkuk University, 1, Hwayang-dong,
Kwangjin-gu, Seoul, 143-701, Korea

[†]Department of Beauty Health, Jungwon University, 85, Munmu-ro,
Goesan-eup, Goesan-gun, Chungbuk, 28024, Korea

(Received August 13, 2017; Revised August 29, 2017; Accepted September 4, 2017)

요약 : 본 연구에서는 잣나무 잎으로 70% 에탄올 추출물과 증류수 추출물을 얻은 후 항산화 효과, 항염증, 미백효과 등 다양한 효과를 검증하고자 연구를 수행하였다. 항산화 실험 결과, 폴리페놀, 플라보노이드 효과에서는 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 농도 의존적으로 증가하였다. 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 증류수 추출물에 비해 에탄올 추출물에서 높은 것으로 확인되었다. B16F10, RAW264.7 세포에서 농도별로 세포독성이 나타나지 않았으며, NO 생성 억제능 측정 결과, LPS로 유도된 NO 생성을 효과적으로 억제하여 항염증 활성이 있을 것으로 예측되었다. 멜라닌 생합성 억제능 측정결과, 유의한 감소효과를 확인하였으며, western blot을 수행하여 MITF, Tyrosinase 단백질 발현억제 실험결과, 농도 의존적으로 현저히 억제됨을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구결과로부터 잣나무 잎추출물은 화장품 소재로서의 다양한 활용 가능성이 있을 것으로 사료된다.

주제어 : 잣나무 잎, 항염증, 항산화, 미백, 화장품 소재

Abstract : This study was performed to verify various effects of 70% ethanol extract and distilled water extract of pine leaf such as antioxidant, anti-inflammatory, skin-lightening effects analysis in cells. The result of antioxidant experiment showed that polyphenol content increased concentration dependently in polyphenol and flavonoid effects. The total content of polyphenols and flavonoids was much higher in ethanol extract than water extract. In all the cells of B16F10,

[†]Corresponding author
(E-mail: mjs@jwu.ac.kr)

RAW264.7 cytotoxicity at each concentration level didn't appear. The result of measuring NO production inhibition showed that it inhibited NO production led to LPS effectively, so anti-inflammatory activity was confirmed. The result of measuring melanin biosynthesis inhibition showed that there was considerably reduction effect, but it performed western blot, and as a result of MITF, Tyrosinase protein revelation, the inhibition of MITF, Tyrosinase revelation was confirmed concentration dependently, Therefore, in this study pine leaf extract was expected to be used as a cosmetic ingredient.

Keywords : *Pinus koraiensis leaf, Anti-inflammation, Anti-oxidant, Whitening, Cosmetic material*

1. 서론

잣나무는 구과목 소나무과의 식물로 학명은 *Pinus koraiensis Siebold et Zucc* 이다. 우리나라 고유의 나무이기 때문에 영어로는 korean pine, 나무를 베면 심재가 붉은 색이어서 홍송(紅松)이라고도 부르며 한자명은 백자목(柏子木)잎이 다섯 장으로 이루어져 있기 때문에 오엽송(五葉松)이라 부른다[1]. 잣나무 잎은 짧은 가지 끝에 5개씩 달리며, 뒷면에는 하얀 기공선이 있어 연한 초록색을 띠며 가장자리에 잔 톱니가 있고, 잣나무 목부의 성분으로는 5-hydroxy-7-methoxyflavone, chrysin, pinocembrin, galangin, 3-hydroxy-5-methoxystilbene, pinosylvin 등의 물질이 함유된 것으로 나타났으며[2], 미국 Forest Farm에서 채취한 잣나무의 성분을 분석한 결과, 잣나무 잎의 성분으로는 gallic acid, protocatechuic acid, vanillic acid, syringic acid, p-coumaric acid, scopoletin, (+)-catechin 등의 물질이 함유된 것으로 보고되었다[3, 4]. 잣나무 잎은 목재나 잣 생산뿐만 아니라 활엽수에 비해 많은 피톤치드를 만드는 것으로 알려져 있어 휴양과 산림치료를 위한 삼림욕장으로도 각광을 받고 있다. 잣나무에서 피톤치드(phytoncide)라는 물질을 만들어내고, 이는 스트레스를 해소시키는 효과가 있는 것으로 알려져 있다. [5] 연구에 따르면 피톤치드요법으로 인체생리대사에 대한 치유 효과를 연구한 결과 뇌파와 혈압과 맥박 이완 작용 및 스트레스 감소, 심리적인 안정 증강되는 효과가 있다고 보고되고 있으며, 항염증, 살균, 탈취, 신경 안정 등 독특한 약리작용 효과[6], 노화방지와 콜레스테롤 저하에도 뛰어난 효과를 나타내는 것으로 보고된 바 있다[7].

잣나무 잎의 대표적 물질 gallic acid를 도토리에서 분리하여 항산화 효과를 측정한 결과[8], gallic acid의 함량이 높아질수록 항산화능이 높아짐을 확인할 수 있었고, syringic acid는 페놀성 화합물로 syringic acid의 에스테르 유도체인 phenylethanoid glycoside는 우수한 항산화 효능을 가진다고 보고하고 있으며[9], (+)-Catechin은 flavan-3-ol이라 불리는 화합물로 대표적인 폴리페놀 그룹에 속하며, 항산화 활성 및 항염증 활성 등 다양한 효능을 나타내는 것으로 알려져 있다[10, 11]. 이 외에도 잣나무 잎의 건조방법에 따라 주름 개선 및 미백 등 우수한 효과를 나타내었다고 보고하였다[12]. [13]의 연구에 따르면 잣은 수확 후 잣 알갱이만 식용으로 사용 후, 잣 구과피 등 그 외의 부산물은 그대로 버려져 환경 오염원으로 방치되고 있기 때문에 효과적인 재활용 방법에 대한 연구가 필요한 실정이다. 국내에서 생식하는 침엽수 중 잣나무가 비교적 많이 분포하고 있으며, 생산하고 난 부산물인 잣나무 잎을 활용한다면, 환경 오염원의 배출량 감소 효과 등 의미 있는 가치 있는 활용 방안과 잣을 생산하고 난 부산물인 잣나무 잎을 활용한 2차 생산 물로서의 활용이 기대된다. 잣 부산물을 이용한 다양한 연구와 잣나무 잎을 이용한 기능성 화장품 제조 및 개발을 위한 다양한 유효성 평가가 필요하다. 따라서 본 연구에서는 잣나무 잎으로부터 70% 에탄올 추출과 증류수 추출 후 두 가지 추출물을 획득 하여 항산화 효과, 미백효과, 항염증효과 등 다양한 효과를 살펴보고자 한다. 이에 본 연구에서는 잣나무 잎의 세포생리활성 및 항후 화장품 기능성 소재로서의 개발 가능성을 제시하고자 한다.

2. 실험

2.1. 실험 재료

2.1.1. 시약 및 기기

본 실험에서 사용된 시약은 Folin-Ciocalteu's phenol reagent, Potassium acetate, Aluminum nitrate, Caffeic acid, Quercetin, DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl), NR solution, Griess reagent, COX-2 primary antibody (Santa Cruz, USA), NR solution, griess reagent, EZ-Cytox, ascorbic acid, PBS (phosphate buffered saline solution), DCF-DA (dichlorofluorescein diacetate), anti-mouse Ig G-Ab, primary antibody (β -actin primary antibody)들은 Sigma-Aldrich (USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2.1.2. 재료 및 추출

본 연구에 사용된 잣나무 잎은 2016년 10월 초 가평군 일대 간별 지역에서 잣나무 잎을 채취하여 실험재료로 사용하였다. 시료의 추출은 70% 에탄올과 증류수를 시료 무게의 10배를 가하여 실온에서 72시간 방치하였다. 72시간 후 얻어진 추출물의 상층액을 정제 후, 추출액만을 분리하기 위하여 원심분리(FinePCR, Korea)를 하였다. 여과지(Whatman[®]No.2filter papers; GE Healthcare Life Sciences, UK)를 이용하여 여과한 후 추출용매인 에탄올을 제거하기 위하여 감압농축기(Korea Bio-Tech Co., Ltd, Eyela)를 통해 에탄올과 증류수를 제거한 뒤 동결 건조하여 최종 추출물을 얻어 본 실험에 사용하였다.

2.1.3. 세포주 및 세포 배양

본 실험에 사용한 세포주인 B16F10 melanoma, RAW264.7 macrophage 세포는 한국 세포주은행(Korean Cell Line Bank, Korea)에서 구입하여 사용하였으며, high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Hyclone, USA) 배지에 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich, USA)와 1% penicillin/streptomycin (100 IU/ 50 μ g/mL, Sigma-Aldrich)이 첨가하여 37[°]C로 유지되는 5% CO₂ 습윤 배양기(Jeio Tech, Korea)에서 배양하였다.

2.2. 실험 방법

2.2.1. 총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량 측정은 Association of Official Agricultural Chemists(AOAC)의 Folin-Denis 방법을[14] 수정하여 Folin-Ciocalteu's phenol reagent가 시료의 페놀성 화합물에 의해 환원되면, 몰리브덴 청색(molybdenum blue)으로 발색되는 원리를 이용하여 정량하였다[15]. 시료를 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, mg/mL의 농도별로 희석한 후 시료 400 μ L와 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 400 μ L를 혼합하여 3분 간 실온에서 반응시켰다. 반응시킨 후 10% Na₂CO₃를 400 μ L를 혼합하여 암실에서 60분 반응시킨 후 상등액 200 μ L씩 96 well plate에 분주하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 동일한 조건으로 3회 반복적으로 실험하여 평균값을 측정하였으며, 표준물질 caffeic acid를 사용하였다. 잣나무 잎 추출물에 함유된 총 폴리페놀 함량은 Caffeic acid (0~100 μ g/mL)의 만들어진 표준곡선 sample의 흡광도 값(Y축)을 대입하여 농도(X축)를 정하였다. 표준물질 농도를 X축, 피크 면적을 Y축으로 하여 검량선을 작성하였으며, 각각의 폴리페놀 성분에 대하여 작성된 검량선식은 직선을 나타내는 상관계수(R²)값을 0.9905로 직선성을 나타내어 표준곡선으로 사용하였다(Fig. 1).

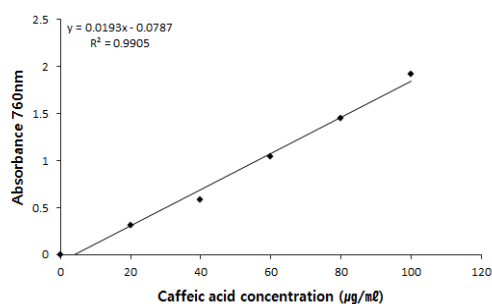


Fig. 1. Standard curve of caffeic acid polyphenol content ($R^2 = 0.9905$)

2.2.2. 총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량 측정은 Moreno *et al.* (2000) 방법[16]을 수정 및 변형하여 측정하였다. 잣나무 잎 추출물을 0.5, 1, 2.5, 5 mg/mL로 희석한 후 시료 100 μ L와 10% Al(NO₃)₃ 20 μ

L, 1 M CH₃COOK 20 μ L, ethanol 860 μ L를 차례로 혼합하여 실온에서 40분 간 방치 후 원심 분리기 (FinePCR, Korea)로 부유물을 가라앉힌 후 96 well plate에 200 μ L씩 분주하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 동일한 조건으로 3회 반복적으로 실험하여 평균값을 측정하였으며, 표준물질 quercetin을 사용하였다. 잣나무 잎 추출물에 함유된 총 플라보노이드 함량은 Quercetin (0~100 μ g/mL)의 만들어진 표준곡선에 sample의 흡광도 값(Y축)을 대입하여 농도(X축)를 정하였다. 표준물질 농도를 X축, 피크 면적을 Y축으로 하여 검량선을 작성하였으며, 각각의 플라보노이드 성분에 대하여 작성된 검량선식은 직선을 나타내는 상관계수(R²)값이 0.9897의 우수한 직선성을 나타내어 표준곡선으로 사용하였다(Fig. 2).

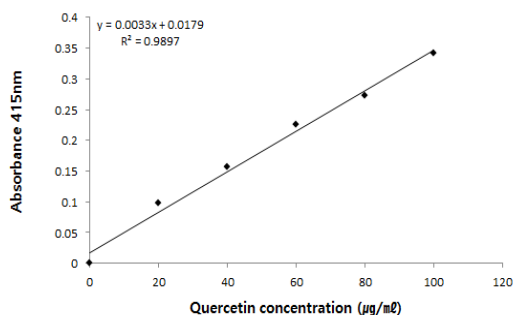


Fig. 2. Standard curve of quercetin flavonoid content ($R^2 = 0.9897$)

2.2.3. NR assay를 이용한 세포 생존율 측정

잣나무 잎 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 neutral red (NR) assay를 이용하여 분석 및 측정하였다[17]. B16F10 세포와 RAW 264.7 세포를 96 well plate에 당 3×10^4 cells/well의 농도로 분주하여 24시간 배양 후 잣나무 잎 추출물을 5, 10, 20, 50, 100 μ g/mL의 농도로 희석하여 각 well plate에 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 48시간 후 무혈청 배지에 1% NR solution (Sigma-Aldrich) 용액이 첨가된 배양액으로 교환하여, 3시간 동안 배양한 후 Phosphate buffered saline (PBS; Sigma-Aldrich, USA)에 10% formaldehyde (Sigma-Aldrich, USA)용액을 첨가하여 각 well에 100 μ L씩 분주하여 20분 동안 고정하였다. NR desorb solution (1% glacial acetic acid (Sigma-Aldrich, USA), 49% ethanol (Duksan,

Korea), 50% distilled water)을 각 well에 100 μ L씩 분주하여 세포 내의 NR을 추출한 다음 microplate reader (Synergy HT, BioTek Instruments, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 본 실험의 세포 생존율은 다음의 식에 따라 산출하였다.

세포 생존율(%) =

$$\frac{\text{시료첨가군의 흡광도(540 nm)}}{\text{시료무첨가군의 흡광도(540 nm)}} \times 100$$

2.2.4. Nitric oxide (NO) 생성 억제능 측정

잣나무 잎 추출물의 NO 생성 억제능은 세포 배양액내 NO양을 nitrite (NO₂⁻)와 nitrate (NO₃⁻) 형태로 측정하는 Green *et al.* (1982)의 방법[18]을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포를 96 well plate에 well당 5×10^4 cells/well의 농도로 분주하고, 24시간 동안 배양 후 배지를 제거한 다음 lipopolysaccharide (LPS) 1 μ g/mL 농도로 처리된 배지에 잣나무 잎 추출물 시료를 5, 10, 20, 50, 100 μ g/mL의 농도로 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 배양된 세포 배양 상층액 100 μ L과 Griess reagent (Sigma-Aldrich, USA) 100 μ L을 새로운 96 well plate에서 혼합하여 차광된 상태에서 10분 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였고 LPS 처리군과 무처리군과 비교하여 백분율로 표시하였다. NO 생성 억제능은 다음의 식에 따라 산출하였다.

NO 생성 저해능(%) =

$$\frac{\text{시료첨가군의 흡광도(540 nm)}}{\text{시료무첨가군의 흡광도(540 nm)}} \times 100$$

2.2.5. 멜라닌 생합성 억제능 측정

멜라닌 생합성 억제능은 B16F10 melanoma 세포를 이용하여 측정하였다[19]. B16F10 세포를 96 well plate에 각 well 당 2×10^3 cells/well의 농도로 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 멜라닌 생성을 촉진하기 위하여 FBS와 α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH; Sigma-Aldrich, USA) 100 nM가 포함된 배지로 교체하였고, 각 시료를 5, 10, 20, 50, 100 μ g/mL의 농도로 처리하여 배양하였다. 멜라닌

생성량은 microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였고, 멜라닌 생성 억제량은 α -MSH 10 nM로 처리한 대조군과 비교하여 백분율로 표시하였다. 멜라닌 생합성 억제능은 다음의 식에 따라 산출하였다.

$$\text{멜라닌 생합성 억제능(\%)} = \frac{\text{시료첨가군의 흡광도(540 nm)}}{\text{시료무첨가군의 흡광도(540 nm)}} \times 100$$

2.2.6. Western blotting

잣나무 잎 추출물에 대한 B16F10 melanoma 세포 내 MITF, tyrosinase 활성 억제능을 확인하기 위해 Western blotting을 실시하였다. B16F10 melanoma 세포를 1.5×10^5 cells/well의 농도로 분주하여 24시간 동안 배양한 후 B16F10 melanoma 세포에 α -MSH 100 nM이 처리된 DMEM 배지에 각각 B16F10 melanoma 세포에 시료 25, 50 μ g/mL 농도로 처리한 다음 48시간 배양한 세포를 수확하여 PBS로 세척 후 radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer [50 mM Tris-Cl (0.2% Tween 20, pH 7.5), 50 mM sodium chloride (NaCl), 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate ($C_{24}H_{39}NaO_4$), 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), protease inhibitor cocktail; Roche, Switzerland]로 첨가하여 세포를 용해한 후 상등액을 회수하였다. 단백질을 변성시키기 위하여 SDS buffer [14.4 mM 2-mercaptoethanol, 60 mM Tris (pH 6.8), 25% glycerol, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue]를 첨가한 후 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용하여 단백질을 분자량별로 분리하였다. 분리된 단백질은 100 V의 조건에서 nitrocellulose membrane (Whatman, GE Healthcare Life Sciences, UK)으로 transfer한 다음 membrane에 옮겨진 단백질을 5% skin milk 용액에서 blocking 한 후 1× tris-buffered saline with tween 20 [TBST; 150 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl (0.2% Tween 20, pH 7.5)]에 희석한 β -actin primary antibody, anti-MITF antibody produced in rabbit, anti-tyrosinase antibody produced in mouse를 처리하고 24시간 동안 교반하였다. Secondary antibody는 anti-mouse IgG antibody, anti-rabbit IgG

antibody (Santa Cruz Biotechnology, USA)을 사용하여 30분 교반하였으며, 교반이 완료된 membrane은 mixture of tris-buffered saline (TBS) and Tween 20 (TBST; 150 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl)로 세척하였다. 세척이 완료된 후 실험용 필름(Konica Minolta, Japan)에서 SuperSignal® WestPicoChemiluminescent Substrate (Pierce, Thermo Fisher Scientific, USA)을 처리하여 필름에 감광을 유도한 다음 암실에서 자동현상기(QX-130II, Konica Minolta)를 이용하여 현상하였다. 현상된 필름상의 단백질 양은 ImageJ (National Institutes of Health, USA)를 이용하여 band 농도차이를 비교하였다.

2.2.7. 통계처리

본 실험의 연구 결과는 평균±표준편차 (mean±standard deviation, M±SD)로 표기하였으며, 통계 처리는 Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) window version 17.0 (IBM, USA)을 이용하여 분석하였다. 유의성 검증은 Student's t-test를 실시하였고, p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다. 모든 실험은 동일한 조건하에 독립적으로 3회 이상 실시하여 실험 결과를 얻어 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 잣나무 잎 추출물의 항산화 효과 측정 결과

3.1.1. 총 폴리페놀 함량

다양한 천연물로부터 분리된 천연 항산화제로는 ascorbic acid, tocopherols, carotenoids, maillardreaction products, aminoacids, peptides, phospholipids 및 폴리페놀과 플라보노이드 등이 있다[20]. 잣나무 잎 70% 에탄올 추출과 증류수 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정하기 위하여 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, mg/mL의 농도로 실험하였고, caffeic acid를 표준 용액으로 하여 작성한 검정 곡선으로부터 각 추출물의 총 폴리페놀 함량을 환산하였다. 실험 결과 0.5 mg/mL의 농도의 증류수 추출물에서 잣나무 잎 추출물의 총 폴리페놀 함량은 43.10 mg/100 g, 70% 에탄올 추출물의 경우 185.74 mg/100 g 으로 잣나무 잎 에

탄을 추출물의 총 폴리페놀 함량이 증류수 추출물에 비해 4배 이상 높은 것으로 확인되었다(Fig. 3). 70% 에탄올 추출물에서의 총 폴리페놀 함량이 농도 의존적으로 증가하였으며 이와 같은 결과는 70% 에탄올 추출물에서 보다 높은 결과가 확인되었는데 유기용매로 추출하는 것이 증류수를 용매로 하여 추출하였을 때 보다 잣나무 잎의 총 폴리페놀 함량이 극성용매 용해도가 높은 것으로 사료된다.

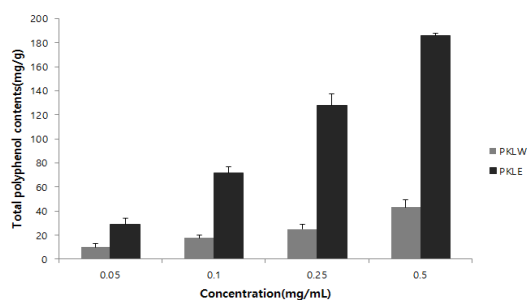


Fig. 3. Total polyphenol content of *Pinus koraiensis* Siebold et Zucc leaf extract. Values represent mean \pm standard deviation of three measurements. PKLW: *Pinus koraiensis* leaf distilled water extract, PKLE: *Pinus koraiensis* leaf 70% ethanol extract.

3.1.2. 총 플라보노이드 함량

잣나무 잎 추출물의 총 플라보노이드 함량을 측정하기 위하여 증류수 추출과 70% 에탄올 추출의 방법으로 0.5, 1, 2.5, 5 mg/mL의 농도로 실험에 사용하였고 quercetin을 표준 용액으로 하여 작성한 검정 곡선으로부터 각 추출물의 총 플라보노이드 함량을 환산하였다. 실험 결과, 잣나무 잎 증류수 추출물에 5 mg/mL 농도에서 총 플라보노이드 함량은 24.70 mg/100 g, 70% 잣나무 잎 에탄올 추출물은 37.94 mg/100 g으로, 70% 에탄올 추출물의 총 플라보노이드 함량이 증류수 추출물에 비해 1.5배 이상 높은 것으로 확인되었다(Fig. 4). 두 가지 추출물 모두에서 농도별로 플라보노이드의 함량이 조금 증가하는 양상을 나타내었다. 이와 같은 결과는 추출 용매에 따라 유효성분의 용출량이 70%에탄올 추출물에서 더 많이 함유하는 것으로 사료된다.

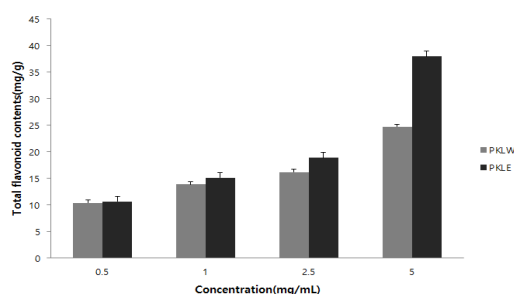


Fig. 4. Total flavonoid content of *Pinus koraiensis* Siebold et Zucc leaf extract. Values represent mean \pm standard deviation of three measurements. PKLW: *Pinus koraiensis* leaf distilled water extract, PKLE: *Pinus koraiensis* leaf 70% ethanol extract.

3.2. 잣나무 잎 추출물의 항염증 효과 측정 결과

3.2.1. RAW 264.7 세포에 대한 세포 생존율 측정

Nutral red (NR) assay는 lysosome에 대한 세포 소기관의 독성을 규명할 수 있는 방법[17]으로 주로 독성물질 검정을 위한 방법으로 사용되고 있다. 본 연구에 사용한 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포에서 잣나무 잎 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 증류수를 이용한 잣나무 잎 추출물과 70% 에탄올을 이용한 잣나무 잎 추출물을 각각 5, 10, 20, 50, 100 μ g/mL의 농도로 처리하고, 48시간 배양하여 NR assay를 실시하였다. 실험 결과, 잣나무 잎 증류수 추출물은 5, 10, 20, 50, 100 μ g/mL 농도까지 86% 이상의 세포 생존율을 나타냈으며, 100 μ g/mL에서 세포 생존율이 13.9% 감소함을 확인하였다. 잣나무 잎 70% 에탄올 추출물의 경우 5, 10, 20, 50, 100 μ g/mL 농도까지 77% 이상의 세포 생존율을 나타냈으며, 100 μ g/mL에서 세포 생존율이 22.2% 감소함을 확인하였으나 (Fig. 5) 세포 생존율에 크게 영향을 주지 않는다고 판단하여 100 μ g/mL 이하의 농도 범위에서 실시하였다.

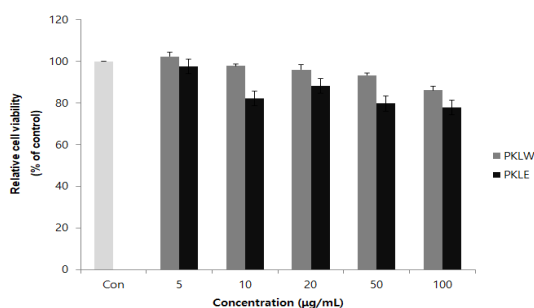


Fig. 5. Effect of *Pinus koraiensis* Siebold et Zucc leaf extract on cell viability in RAW 264.7 cells. Values represent mean \pm standard deviation of three measurements. PKLW: *Pinus koraiensis* leaf distilled water extract, PKLE: *Pinus koraiensis* leaf 70% ethanol extract.

3.2.2. RAW 264.7 세포에 대한 NO 생성 억제능 측정

활성 질소종(reactive nitrogen species)의 하나이며, 최근 염증 반응의 중요한 작용인자로 알려진 NO 생성 저해에 미치는 잣나무 잎 추출물의 효과를 알아보기 위하여, RAW 264.7 세포에 염증 매개 물질인 LPS를 처리하여 NO 생성을 유도시킨 후 증류수를 이용한 잣나무 잎 추출물과 70% 에탄올 추출물을 각각 5, 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도별로 RAW 264.7 세포에 처리하여 NO 생성 억제능을 측정하여 Fig. 6에 나타내었다. LPS 처리군에 비해 잣나무 잎 증류수 추출물은 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 21.45% 감소하였고, 잣나무 잎 70% 에탄올 추출물의 경우 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 25.62%의 NO 생성 억제율이 유의성 있는 결과를 나타내었다. 이와 같은 결과는 인진호 추출물과 같은 농도에서 농도 의존적으로 NO 생성 억제에 효과가 있다는 연구와[21] 일치하였다. 항염증 효능에 대한 작용은 여러 연구에서 증명되었고, 플라보노이드가 lipoxygenase와 cyclooxygenase pathway를 억제[22, 23], free radical 생성을 억제[24], histamine 유리 억제[25], 과민 반응 억제[26] 등의 연구결과들이 발표되어있고, 이와 같은 결과는 잣나무 잎의 높은 플라보노이드 성분이 NO 생성 억제와 관련 있다고 보여진다.

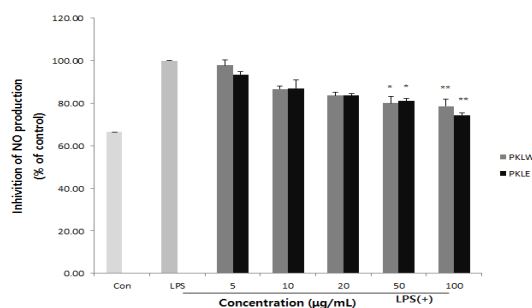


Fig. 6. Inhibitory effect of *Pinus koraiensis* Siebold et Zucc leaf extract on LPS-induced NO production by RAW 264.7 cells. Result is represented as mean \pm SD. * p <0.05, ** p <0.01. LPS: lipopolysaccharide. PKLW: *Pinus koraiensis* leaf distilled water extract, PKLE: *Pinus koraiensis* leaf 70% ethanol extract.

3.3. 잣나무 잎 추출물의 항멜라닌 효과 측정 결과

3.3.1. B16F10 세포에 대한 세포 생존율 측정

본 연구에 사용한 마우스 피부 유래 멜라닌 형성 세포인 B16F10 세포에 대한 잣나무 잎 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 증류수와 70% 에탄올을 추출물을 이용하여 각각 5, 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하고, 48시간 배양하여 NR assay를 실시하였다. 실험 결과, 잣나무 잎 증류수 추출물 5, 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도까지 86% 이상의 세포 생존율을 나타냈으며, 잣나무 잎 70% 에탄올 추출물의 경우 5, 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 87% 이상의 세포 생존율이 나타나 모든 농도에서 세포 독성이 나타나지 않는 것을 확인하였다(Fig. 7).

3.3.2. B16F10 세포에 대한 멜라닌 생합성 억제능

잣나무 잎 추출물의 멜라닌 생합성 억제 효과를 확인하기 위해 α -MSH에 의해 유도된 B16F10 세포에 잣나무 잎 추출물을 농도별로 처리하여 멜라닌 생합성 억제능을 측정하였다(Fig. 8). α -MSH 10 nM을 처리한 B16F10 세포에 멜라닌 생성을 유도시켜 70% 에탄올로 추출한 잣나무 잎 추출물과 증류수를 이용한 잣나무 잎

추출물을 5, 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리한 후 양성 대조군 arbutin을 사용하여 멜라닌 세포에 의해 생산된 멜라닌 생성량을 비교하였다. 증류수 추출물의 경우 별다른 변화가 없었고, 70% 에탄올 추출물의 경우 멜라닌 생합성을 억제하여 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 14.39%, 17.68%의 유의한 감소효과를 확인하였다. α -MSH 단독 처리한 negative control과 비교했을 때 잣나무 잎 추출물의 미백효과는 약하다는 것을 확인 할 수 있었다.

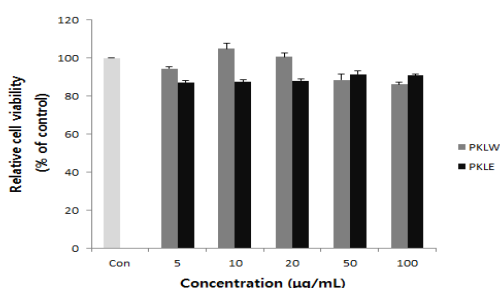
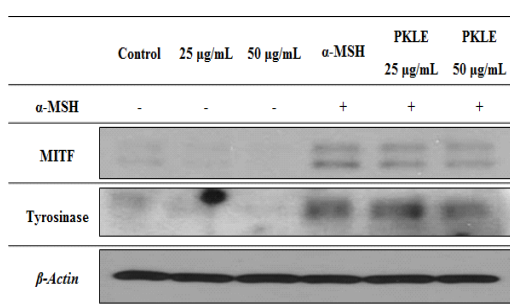


Fig. 7. Effect of *Pinus koraiensis Siebold et Zucc* leaf extract on cell viability in B16F10 cells. Values represent mean \pm standard deviation of three measurements. PKLW: *Pinus koraiensis* leaf distilled water extract, PKLE: *Pinus koraiensis* leaf 70% ethanol extract.



(A)

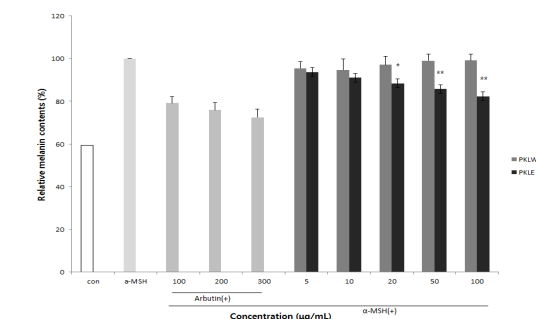
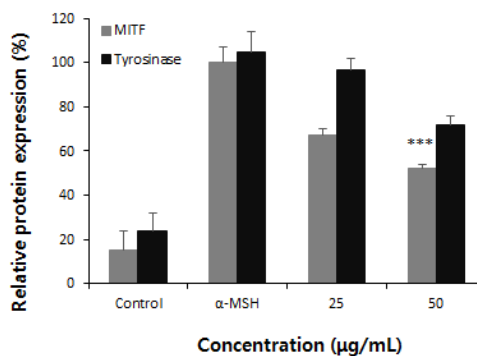


Fig. 8. Inhibition of melanin synthesis in B16F10 melanoma cells treated with *Pinus koraiensis Siebold et Zucc* leaf extract. Result is represented as mean \pm SD. * p <0.05, ** p <0.01. PKLW: *Pinus koraiensis* leaf distilled water extract, PKLE: *Pinus koraiensis* leaf 70% ethanol extract.

3.3.3. B16F10 세포에 대한 MITF, Tyrosinase 활성 억제능 측정

멜라닌 생성 신호전달 경로는 cAMP/PKA 경로 외에도 diacylglycerol/protein kinase A (DAG/PKA)경로와 Ras활성에 의존적인 MAPK 등의 경로가 존재한다[27]. ERK는 membrane-to-nucleus 신호를 통해 세포의 증식, 분화에 관여하며, ERK의 활성화는 MITF의 serine 73을 인산화시킴으로써 ubiquitin-dependent proteasome pathway를 통해 MITF의 분해를 유



(B)

Fig. 9. Effect of *Pinus koraiensis Siebold et Zucc* leaf extract on the MITF and tyrosinase expression in B16F10 melanoma cells. Result is represented as mean \pm SD. *** p <0.001, α -MSH: α -melanocyte stimulating hormone. PKLE: *Pinus koraiensis* leaf 70% ethanol extract. (A): Image, (B): Graph

도하고 그 결과 tyrosinase의 전사가 저해된다고 알려져 있다[28]. 잣나무 잎 추출물의 MITF, tyrosinase의 발현 억제를 확인하기 위해 멜라닌 생합성 자극 호르몬인 α -MSH 10 nM을 멜라닌 형성세포 B16F10 세포에 처리하였다. 잣나무 잎 추출물을 25, 50 μ g/mL의 농도별로 처리한 후 Western blot을 이용하여 MITF, tyrosinase의 활성억제 효과 결과를 Fig. 9에 나타내었다. 실험 결과, 잣나무 잎 추출물의 MITF 억제 효과는 50 μ g/mL 농도에서 48% 활성 억제 효과로 $p < 0.001$ 유의한 결과를 나타냈다. tyrosinase의 경우 같은 농도에서 33% 활성 억제를 확인하였다. 이와 같은 결과는 잣나무 잎 추출물이 단백질 발현을 억제하여 멜라닌 생성 억제 효과가 있으므로 미백 기능성 화장품의 원료로서 사용 가능하다고 사료된다.

4. 결론

본 연구에서는 잣나무 잎 추출물에 대한 화장품 소재로서 활용 가능성을 검토하고자 하였다. 잣나무 잎 추출물의 항산화 활성 및 피부 세포 활성에 대한 결과는 다음과 같다.

1. 잣나무 잎 70% 에탄올 추출물에서 폴리페놀과 플라보노이드 모두 우수한 항산화력을 확인하였고, 뛰어난 항산화 효과로 피부 노화에 도움이 될 것으로 개발 가능성이 확인되었다.
2. RAW 264.7, B16F10 세포의 세포 생존율 및 세포독성을 확인한 결과 5~100 μ g/mL 농도까지 처리한 모든 농도의 증류수 추출과 70% 에탄올 추출 방법 모두에서 세포독성이 나타나지 않았으며, 높은 생존율을 확인하였다.
3. 잣나무 잎 추출물 두 가지 추출 방법 모두에서 NO생성 억제효과를 확인하였으며, 특히 70% 에탄올 추출물 50, 100 μ g/mL 에서 유의하게 억제 하여 NO생성 억제와 항염 작용으로 항염증 제제의 개발 가능성 확인하였다.
4. 70% 에탄올 잣나무 잎 추출물의 MITF 억제 효과는 50 μ g/mL 농도에서 48% 활성

억제 효과를 확인하였고, tyrosinase의 경우 같은 농도에서 33% 활성 억제 효과로 단백질 발현을 억제하여 멜라닌 생성 억제 효과가 있으므로 미백 기능성 화장품의 원료로서 사용 가능성을 확인하였다.

본 연구 결과를 종합적으로 고려해볼 때, 잣나무 잎 추출물은 항산화 활성, 항염증 및 미백개선 효과를 확인하여, 이상의 결과로 잣나무 잎 추출물을 기능성 화장품 소재로서의 활용 가치가 있을 것으로 사료된다.

References

1. Hwang SJ, Park SJ, Kim JD. "Component analysis and antioxidant activity of *Oenanthe javanica* extracts", *Korean J. Food Sci. Technol.*, vol. 45, pp. 227-234, (2013).
2. Marples RR, "The microflora of the face and acne lesions", *J. Invest. Dermatol.*, vol. 62, pp. 326-331, (1974).
3. Bae BH, Kim YO. "Effect of leaves Aqueous Extracts from Some Gymnosperm Plant on the Seed Germination, Seedling Growth and Transplant of *Hibiscus syriacus* Varieties", *Journal of Ecology and Field Biology*, vol. 26, pp. 39-42, (2003).
4. Cuyckens F, Claeys MJ. "Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids", *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 39, pp. 1, (2004).
5. Lee BK, Lee HH. "A Study on the Effects of Human Physiology after Forest Phytoncide Therapy", *Journal of Naturopathy.*, vol. 1, pp. 14-20, (2012).
6. Jang SJ. "Essential Oil Composition from Leaves, Flowers, Stems, and Fruits of *Vitex rotundifolia* L. fil", *Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, vol. 45, pp. 101-107, (2002).
7. Hwang BH, Jo JH, Ham SS, and Kang HY. "Chemical analysis of pinus leaves", *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, vol. 29, pp. 6-9, (2000).

8. Lee MH, Jeong JH, Oh MJ. "Antioxidant activity of gallic acid in acorn extract", *J. Korean Soc. Food Nutr.*, vol. 21, pp. 693-700, (1992).
9. Heilmann J, Calis I, Kirmizibekmez H, Schuhly W, Harput S, Sticher O. "Radical Scavenger activity of phenylethanoid glycosides in FMLP stimulated human polymorphonuclear leukocytes; Structure activity Relationships", *Planta Med.*, vol. 66, pp. 746-748, (2000).
10. Skrzydlewska E, Ostrowska J, Farbiszewski R, Michalak K. "Protective effect of green tea against lipid peroxidation in the rat liver, blood serum and the brain", *Phytomedicine.*, vol. 9, pp. 232-238, (2002).
11. Yokozawa T, Nakagawa T, Kitani K. "Antioxidative activity of green tea polyphenol in cholesterol-fed rats", *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, pp. 3549-3552, (2002).
12. Jo JB, Park HJ, Lee EH, Lee JE, Lim SB, Hong SH, Cho YJ. "Whitening and anti-wrinkle effect of *Pinus koraiensis* leaves extracts according to the drying technique", *J. Appl. Biol. Chem.*, vol. 60, pp. 73-8, (2017).
13. Li K, Qingwang L, Jian L, Zhang T, Han Z, Gao D, Zheng F. "Antitumor activity of the procyanidins from *Pinus koraiensis* bark on mice bearing U14 cervical cancer", *Yakugaku Zasshi.*, vol. 127, pp. 1145-1151, (2007).
14. Folin O, Denis W. "On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 12, pp. 239-243, (1912).
15. Gutfinger T. "Polyphenols in olive oils", *Journal of the American Oil Chemists Society*. vol. 58, pp. 966-968, (1981).
16. Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 71, pp. 109-114, (2000).
17. Borenfreund E, Puerner JA, "Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption", *Toxicol. Lett.*, vol. 24, pp. 119, (1985).
18. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipp PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. "Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids", *Anal Biochem.*, vol. 126, pp. 131-138, (1982).
19. Lim HW, Cho NY, Yoon MY, Cha SB, Kim KW, Park YM, Lee JY, Lee JH, Kim CJ, Sim SS. "Effects of *citrus* essential oils on melanin production in B16 melanoma cells", *Yakhak Hoeji*, vol.47, pp. 25-30, (2003).
20. Hahm, T S, King, DL, Min DB. "Food antioxidants", *J. Food Biotechnol.*, vol. 2, pp. 1-8, (1993).
21. Kim J, Lee CW, Kim EK, Lee SJ, Park NH, Kim HS, Kim HK, Char K, Jang YP, Kim JW. "Inhibition effect of *Gynura procumbens* extract on UV-B-induced matrix-metalloproteinase expression in human dermal fibroblasts", *J. Ethnopharmacol.*, vol. 137, pp. 427-433, (2011).
22. Yamamoto S, Yoshimoto T, Fukukawa M, Horie T, Watanabe Kono S. "Arachidonate lipoxygenase and its new inhibitors", *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 74, pp. 349, (1984).
23. Baumann J, Bruchhause F, Wurm G. "Flavonoids and arachidonic acid metabolism", Farkas L, K'allay, F. and Wagner. H(eds). *Flavonoids and bioflavonoids*, *Akad'emiai kiado. Budapest.*, pp. 411, (1982).
24. Busse WW, Kopp D, Middleton E, Jr. "Flavonoid modulation of human neutrophil function", *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 73, pp. 801, (1984).
25. Middleton E, Jr, Drzewiecki G. "Flavonoid inhibition of human basophil histamine stimulated by various agent", *Bio. Pharm.*, vol. 33, pp. 33, (1984).

26. Kim CJ, Chung JM. "Pharmacological activities of flavonoid(I), relationships of chemical structure of flavonoid and their inhibitory activity of hypersensitivities", *Yakhak. Hoeji.*, vol. 34, pp. 348, (1990).
27. Park HY, Wu C, Yonemoto L, Murphy-Smith M, Wu H, Stachur CM. "Gilchrist BA, MITF mediates cAMP-induced protein kinase C-beta expression in human melanocytes", *J. Biochem.*, vol. 395, pp. 571-578, (2006).
28. Kim DS, Hwang ES, Lee JE, Kim SY, Kwon SB, Park KC, "Sphingosine-1-phosphate decreases melanin synthesis via sustained ERK activation and subsequent MITF degradation", *J. Cell Sci.*, vol. 116, pp. 1699-1706, (2003).